

拟南芥细胞异三聚体 G 蛋白的分离纯化

谢虹, 杨飞武, 郭莹, 梁建生

(扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 以拟南芥哥伦比亚 *Columbia* (Col-0) 野生型悬浮培养细胞为材料, 采用超声波破碎、匀浆、离心、40%~60% 饱和度硫酸铵分步沉淀、Sephadex G-25 脱盐、DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换、Sephadex G-200 凝胶过滤, 最后经过 Sepharose CL-6B 得到纯化的目的蛋白, 蛋白收率为 0.097%。纯化的蛋白质经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定显示为一条带, 经 Western blotting 证实为 G 蛋白。把经 Native-PAGE 鉴定的蛋白质的条带回收, 进行 SDS-PAGE 显示有 3 条带。一条是 $G\alpha$ 亚基, 其分子量为 60kDa 左右; 另外 2 条带分子量为 45kDa 和 35kDa, 可能是 β 、 γ 亚基, 初步证实拟南芥中存在异三聚体 G 蛋白。G 蛋白提取方法的建立为在基因突变型拟南芥中 G 蛋白功能的研究奠定基础。

关键词: 拟南芥; 异三聚体 G 蛋白; 亚基; 纯化

中图分类号: Q946.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2008)02-0269-04

Separation and purification of G protein from *Arabidopsis thaliana*

XIE Hong, YANG Fei-Wu, GUO Ying, LIANG Jian-Sheng

(College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: G protein was purified from the suspended cultured wide-type cell of *Arabidopsis thaliana* (Col-0) by ultrasonic fragmentation, homogenization, centrifugation, 40%~60% saturation Ammonium sulphate sedimentation, gel filtration (Sephadex G-25, Sephadex G-200, Sepharose CL-6B) and DEAE-Sepharose Fast Flow ion exchange chromatographer. The result identified by non-denatured PAGE showed one band in the gel and Western blotting analysis confirmed that the protein was G protein. The target protein after Native-PAGE was collected, and it displayed three bands after SDS-PAGE. The first band was α subunit, and its MW was about 60kDa. The second and third bands which were 45kDa and 35 kDa, were presumed to be the β and γ subunits. The purification method of G protein will facilitate further function investigation of G protein in mutant-type cell of *A. thaliana*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; heterotrimeric G proteins; subunit; purification

G 蛋白(G protein/GTP binding protein)于 20 世纪 80 年代首先在动物中被发现, 其介导的信号转导机理被广泛而深入地研究(Sakmar, 2002)。G 蛋白由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成三聚体, 分子量 100 kDa 左右。G 蛋白通过其亚基上氨基酸残基的脂化修饰将其锚定在细胞膜内表面上, $G\alpha$ 上结合着 GDP, 并与 $G\beta\gamma$ 共同构成三聚体形式(孙大业等, 2001)。当

位于膜表面的受体(GPCRs)与配基结合后, 受体被活化并催化 $G\alpha$ 上的 GDP 解离, 并在同一位置上结合 GTP 导致 $G\alpha$ 构象变化, 使 $G\alpha$ 与 $G\beta\gamma$ 解离, 从而各自调节胞内效应器并由后者导致一系列下游生理生化反应。同时由于 $G\alpha$ 本身具有内源的 GT-Pase 活性, 水解 GTP 为 GDP, 使 $G\alpha$ 变为非活化态, 与 $G\beta\gamma$ 再次结合成三聚体而完成一次信号过程

收稿日期: 2006-08-18 修回日期: 2007-06-08

基金项目: 国家自然科学基金; 海外杰出青年基金(30528023)[Supported by the National Natural Science Foundation of China; Funds for Talented Overseas Young Scholars(30528023)]

作者简介: 谢虹(1968-), 女, 福建永安人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事生物化学与生物工程等教学与科研, (E-mail)xiehongwjn@yahoo.com.cn.

(Jones & Assmann, 2004)。大量研究发现 G 蛋白偶联信号转导系统是一类重要的细胞信号传导途径,其在简单真核生物、高等动物及植物中普遍存在。G 蛋白在真核细胞膜信号的分选和扩大、蛋白质的合成与运输、细胞骨架的形成、囊泡在细胞内的运输以及细胞增殖及分化等方面起重要的调节作用。

虽然在植物中 G 蛋白的研究处于相对滞后阶段,但在拟南芥的叶片和根、水稻的胚芽鞘等多种植物细胞中检测到了 G 蛋白的存在。在植物体中,异三聚体 G 蛋白参与了生长发育的诸多过程,如气孔开关、细胞周期调节、根的发育(Ullah & Chen, 2001; Pandey & Assmann, 2004)、光信号转导和光控发育以及病原信号转导(Komatsu & Yang, 2004)过程。

哺乳动物目前发现 23 种 G α , 6 种 G β , 12 种 G γ 蛋白,每个亚基都由多基因编码,从而构成多种多样的可能组合方式。植物中仅在水稻中有报道称 α 、 β 、 γ 亚基形成了类似于动物细胞中的异三聚体状态(Kato & Mizutani, 2004),拟南芥中是否存在异三聚体 G 蛋白尚未见相关报道,大量的基因序列信息表明可能只有 1 种 α 亚基(GPA1)、1 种 β 亚基(AGB1)和 2 种 γ 亚基(AGG1、AGG2)(Ellis & Miles, 2001)。最近对 G 蛋白偶联信号途径的研究显示 G 蛋白 G α 、G β 和 G γ 三个亚基间的相互作用对阐明其信号转导机理至关重要,而研究亚基间的相互作用必须先分离纯化相应的蛋白质。由于蛋白质的纯化与序列分析难度较大,到目前为止,还很难完全纯化一种植物异三聚体 G 蛋白。一方面人们利用已知 G 蛋白保守氨基酸序列合成的寡核苷酸为探针的方法对植物中可能存在的 G 蛋白亚基的基因进行研究;另外通过重组 G 蛋白的分离纯化来研究 G 蛋白在细胞信号转导中可能的作用途径。但重组 G 蛋白在宿主细胞中表达过程中存在修饰化的缺失和 G 蛋白亚基的丢失等问题。本文以拟南芥哥伦比亚(col)野生型悬浮培养细胞为材料,探索纯化 G 蛋白的途径,优化提取方法,为 G 蛋白后续的研究做一些基础工作。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型 Columbia (Col-0)种子由美国北卡立罗那大学 Alan M Jones 教

授惠赠。植株生长于本实验室的温室,其悬浮培养细胞系为叶片组织培养细胞,于冷冻冰箱 MS 液体培养基培养至一定浓度后,收集贮于-86 °C。

1.2 主要试剂

G 蛋白 α 亚基(AtGPA1)抗体,是按照 α 亚基氨基酸序列合成的寡肽免疫兔子后采集的血清;Sephadex G-25、Sephadex G-200、硝酸纤维素膜(NC)购于 Amersham 公司;DEAE Sepharose Fast Flow 和 Sepharose CL-6B 为 Sigma 公司产品;低分子量标准蛋白质购于中国科学院上海生物化学研究所;二抗(Goat anti Rabbit IgG-HRP)购于上海 Sangon 公司。

1.3 蛋白质浓度测定

蛋白质浓度的测定用紫外吸收法,以 BSA 为标准蛋白。

1.4 蛋白纯度鉴定、分子量测定和 Western blotting

蛋白纯度分别用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定,6%分离胶。分子量测定用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,12%分离胶。Western blotting 以 G 蛋白 α 亚基(AtGPA1)的抗体跟踪检测 G 蛋白的存在。以上方法参照《蛋白质技术手册》(汪家政等,2000)中的方法进行。

1.5 蛋白质提取

蛋白质提取参照 Kashino(2003)和 Lehner 等(2003)的方法。称取拟南芥细胞 100 g,按 1:1(w/v)加入 100 mL Buffer A(含 50 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF, 300 mmol/L 蔗糖, 1 mol/L NaCl, pH8.0),用细胞超声破碎仪于冰浴上破碎 30s \times 10,间隔 30 s,然后 4 °C、11 000 r/min 离心 20 min,取上清。沉淀在冰浴上研磨后,与上清合并,在 4 °C 摇床上振荡 3 h。离心弃沉淀,收集上清液 170 mL。上清液逐步加入硫酸铵至饱和度为 40%,于冰浴上搅拌 30 min,离心弃沉淀,上清液加入硫酸铵至饱和度为 60%,于冰浴上搅拌 30 min 后,离心收集沉淀。沉淀用尽量少的 Buffer B(含 50 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 巯基乙醇, 0.1 mmol/L PMSF, 0.025 mmol/L GDP, pH8.0)溶解后,上 Sephadex G-25(1.6 cm \times 90 cm)层析柱,量程为 2A。加入 Buffer B 洗脱,流速为 2 mL/min,每分钟收集 1 管。合并含有目的蛋白的洗脱液上 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析柱(1.6 cm \times 50 cm)后,先用 Buffer C(含 20 mmol/L Tris, 1 mmol/L ED-

TA, 5 mmol/L 巯基乙醇, 0.1 mmol/L PMSF, 0.025 mmol/L GDP, pH8.0) 开始洗脱, 流速为 0.25 mL/min, 量程为 1A, 再用含 0.15 mol/L NaCl 的 Buffer C (pH8.0) 洗脱, 然后用含 0.3 mol/L NaCl 的 Buffer C (pH8.0) 洗脱, 收集合并目的蛋白溶液上 Sephadex G-200 (1.6 cm×90 cm), 用 Buffer B 洗脱, 流速为 0.25 mL/min, 设定量程为 0.2 A, 每 5 min 收集 1 管, 合并蛋白质洗脱液进行冷冻干燥后, 用少量洗脱剂 Buffer B 溶解上 Sepharose CL-6B 层析柱 (1.6 cm×50 cm) 进行纯化。用 Buffer B 洗脱, 流速为 0.6 mL/min, 设定量程为 0.5 A, 每分钟收集 1 管, 合并目的蛋白。

2 结果

2.1 蛋白质收率

称取 -86 °C 冻存的 100 g 拟南芥细胞, 破碎后按照目的蛋白的提取步骤进行, 同时分别测定每一步骤蛋白溶液的体积和蛋白质含量, 测得各个步骤中蛋白质的含量如表 1 所示。

表 1 G 蛋白收率
Table 1 The recovery rate of G protein

蛋白质样品 Sample	总体积 vol. (mL)	蛋白质浓度 (mg/mL)	总蛋白 Total protein(g)
粗提液 Crude extract	170	24.45	4.108
分步沉淀 Step precipitation	20	69.70	1.359
Sephadex G-25 洗脱液	40	27.64	1.078
DEAE-Sepharose FF 洗脱液	51.5	2.77	0.138
Sephadex G-200 洗脱液	50	0.79	0.040
Sepharose CL-6B 洗脱液	4.2	1.03	0.004

从表 1 可看出, 拟南芥细胞经过破碎、离心后, 溶液中总蛋白约 4.108 g; 硫酸铵分步沉淀除去了一部分的杂蛋白; 而 DEAE-Sepharose FF 洗脱后, 含目的蛋白的溶液中蛋白质总量只有之前的三分之一, 这一步骤除去了大量的杂蛋白; 最后经过 Sephadex G-200 和 Sepharose CL-6B 洗脱, 纯化的蛋白质的收率只有 0.097%。

2.2 硫酸铵分步沉淀

细胞破碎后获得上清液, 用 20%~40%、40%~60% 和 60%~80% 饱和度硫酸铵进行沉淀。经 Western blotting 鉴定后结果如图 1。G 蛋白主要存在 40%~60% 饱和度硫酸铵沉淀中。

2.3 层析分离 G-蛋白

样品经硫酸铵分步沉淀后, 用葡聚糖凝胶 Sepha-

dex G-25 脱盐以便进一步纯化, 经 Western blotting 鉴定可知图 2 中第一峰为 G-protein 所在。脱盐的蛋白质溶液经过 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析, 在洗脱剂中逐渐提高 NaCl 的浓度分段洗脱目的蛋白, 以除去大量的杂蛋白 (图 3)、两步凝胶过滤后 (图 4、5), 通过电泳鉴定, 得到较纯的目的蛋白。

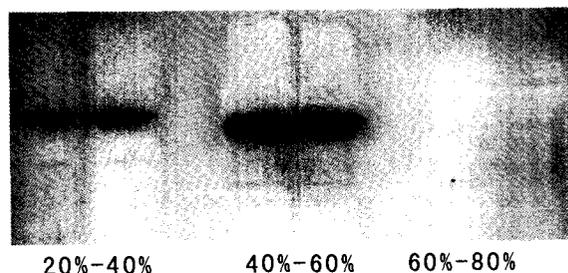


图 1 G 蛋白的饱和硫酸铵沉淀
Fig. 1 G protein precipitation by different saturation of ammonium sulfate

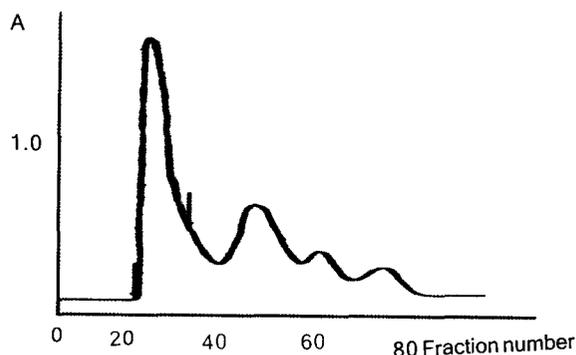


图 2 Sephadex G-25 层析图
Fig. 2 Sephadex G-25 gel filtration profile of G-protein

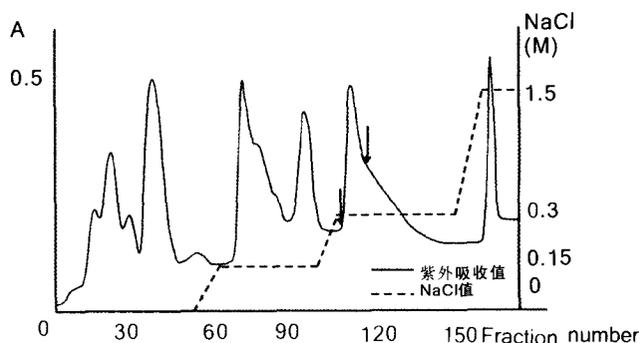


图 3 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析图
Fig. 3 DEAE-Sepharose Fast Flow ion exchange column chromatogram of G-protein

目的蛋白洗脱液的收集是通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定进行的, 利用 G-protein 的 α 亚

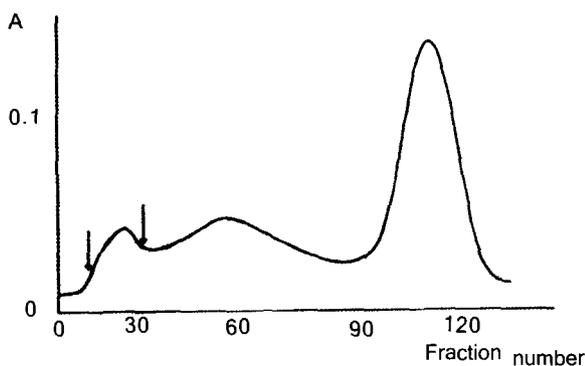


图 4 Sephadex G-100 凝胶过滤层析图
Fig. 4 Sephadex G-100 gel filtration profile of G-protein

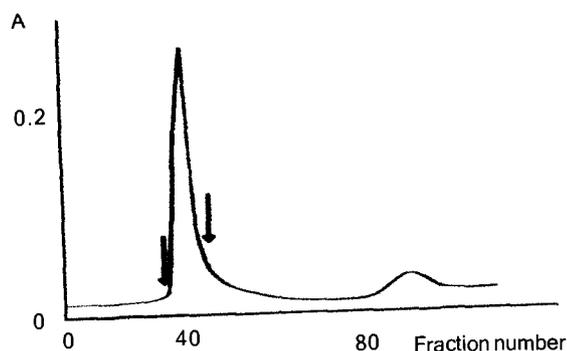


图 5 Sepharose CL-6B 凝胶过滤层析图
Fig. 5 Sepharose CL-6B gel filtration profile of G-protein

基的一抗与目的蛋白洗脱液中 G-protein 的 α 亚基特异结合确定收集管中是否含有 G-protein(图 6)。

2.4 蛋白亚基鉴定

纯化的 G 蛋白溶液与粗提液进行 Native-PAGE 后(图 7:a,b)胶上只有一条带,可知所得 G-蛋白已较纯。另一块 Native-PAGE 的胶进行转运后 Western blotting 鉴定,确定该条带为 G 蛋白(图 7:c)。

取经过 6 步分离纯化获得的目的蛋白溶液,进行 Native-PAGE 后,固定、染色胶块,用刀片切下含有目的蛋白的胶条,并切成 1 mm^3 的小块,加液氮研磨,然后加入少量 SDS-PAGE 样品缓冲液,沸水浴 10 min,最后 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、11 000 r/min 离心 30 min,取上清,用于 SDS-PAGE,结果如图 7:d。在 SDS-PAGE 胶上可以看到 3 条带,第一条带颜色深,而且清晰可见,为 G 蛋白 α 亚基(与 Western blotting 鉴定结果一致);第二条带颜色较淡,分子量为 45kDa 左右,与文献报道的 β 亚基分子量(43kDa)相近;第三条带颜色更淡,分子量为 35kDa 左右,有可能为 γ 亚基。

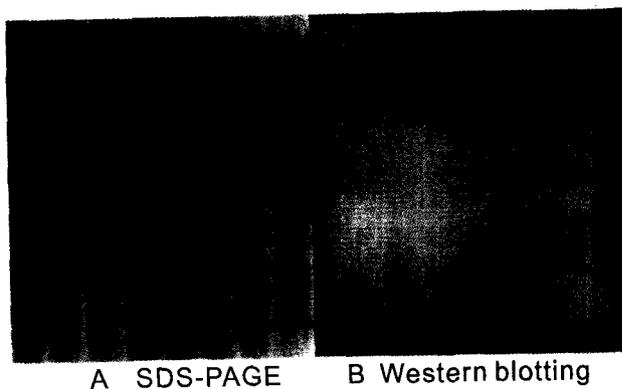


图 6 G-蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定
Fig. 6 SDS-PAGE and Western blotting identification of G-protein

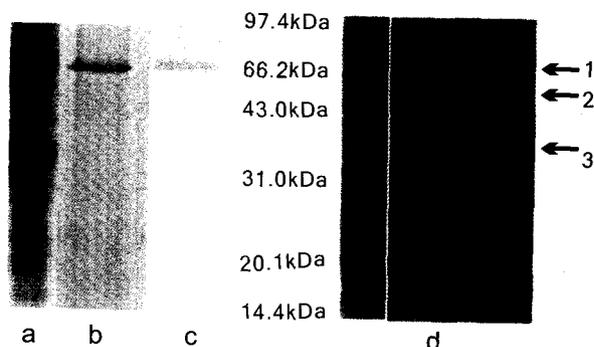


图 7 G-蛋白的鉴定
Fig. 7 Characterization of G-protein
a. 粗提液的 Native-PAGE; b. Sepharose CL-6B 洗脱液 Native-PAGE; c. 免疫印迹; d. SDS-PAGE。

3 讨论

迄今为止,关于 G 蛋白分离纯化的报道很少,即使有也是基于重组细胞 G 蛋白亚基的分离,从天然状态下的细胞中分离纯化 G 蛋白的报道还没有。由于蛋白纯化过程相当长而复杂,工作量大,收率极低,因此很难从组织细胞中分离纯化得到 G 蛋白。本试验以拟南芥野生型细胞为材料,通过层析分离等方法,获得了少量的较纯的 G 蛋白,只能用于做一些初步的定性鉴定,没有能够做 HPLC 测定和氨基酸序列测定,但优化了一套植物 G 蛋白分离纯化的方法,为以后实验室开展植物 G 蛋白性质和功能研究奠定了理论基础。同时初步证实了 G 蛋白可能有 3 个亚基组成,其中一条为 α 亚基是可以确定的,但由于本试验无法得到 β 、 γ 亚基的抗体,所以还(下转第 147 页 Continue on page 147)

- A conspectus[J]. *J S Afr Bot*, **40**:169—187
- Pailler T, Maurice S, Thompson J D. 2002. Pollen transfer patterns in a distylous plant with overlapping pollen-size distributions[J]. *Oikos*, **99**:308—316
- Pérez R, Vargas P, Arroyo J. 2004. Convergent evolution of flower polymorphism in *Narcissus* (Amaryllidaceae)[J]. *New Phytol*, **161**:235—252
- Riveros G M, Barria O R, Humana P A M. 1995. Self-compatibility in distylous *Hedyotis salzmanni* (Rubiaceae)[J]. *Plant Syst Evol*, **194**:1—8
- Ryu T Y, Yeam D Y, Kim Y J, et al. 1976. Studies on heterostyly incompatibility of *Abeliophyllum distichum*[J]. *Seoul Nat Univ Coll Agric Bull*, **1**:113—120
- Sage T L, Strumas F, Cole W W, et al. 1999. Differential ovule development following self-and cross-pollination: The basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae)[J]. *Am J Bot*, **86**:855—870
- Sampson D R. 1971. Mating group ratios in distylic *Forsythia* (Oleaceae)[J]. *Can J Genet Cytol*, **13**:368—371
- Verdoorn I C. 1963. Oleaceae[J]. *Flora S Afr*, **26**:100—128
- Webb C J, Lloyd D G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Herkogamy[J]. *New Zeal J Bot*, **24**:163—178
- Xue MN(薛妙男), Li N(李楠), Zhang XH(张杏辉), et al. 2000. The time and space relations on the glycoprotein forming from self-incompatibility style of *Shatinyu* (沙田柚自交不亲和和花柱糖蛋白产生的时空关系)[J]. *Guihaia*(广西植物), **20**(2):164—167

连翘的二型花柱

阮成江

(大连民族学院 生物技术与资源利用国家民委教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600)

摘要: 报道了连翘中的二型花柱(长花柱和短花柱)。长花柱的柱头和雄蕊高度分别为 6.12 ± 0.05 mm 和 2.35 ± 0.04 mm, 短花柱则为 2.23 ± 0.04 mm 和 6.02 ± 0.06 mm。短花柱花的花冠大小明显超过长花柱。开放授粉条件下, 长短花柱花的座果率分别为 $9.11\% \pm 0.04\%$ 和 $8.93\% \pm 0.07\%$ 。人工异交的座果率在长—短 ($36.8\% \pm 0.04\%$) 与短—长 ($36.2\% \pm 0.07\%$) 组合间无明显差异 ($F_{(1,39)} = 1.38, P = 0.14$)。人工异交实验表明, 传粉者限制可能发生在生长于中国东北部的人工连翘种群中, 这可能是因为该地区早春的低温和多风气候条件影响传粉者的种类和活动。

关键词: 二型花柱; 连翘; 花性状

(上接第 272 页 Continue from page 272)

需要进一步通过拟南芥 β 亚基和 γ 亚基缺失突变体细胞中提取蛋白质试验进行确证。

参考文献:

- 孙大业, 郭艳林, 马力耕, 等. 2001. 细胞信号转导(第 3 版)[M]. 北京: 科学出版社
- 汪家政, 范明. 2000. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社
- Ellis B E, Miles G P. 2001. One for all[J]. *Science*, **292**:2 022—2 023
- Jones A M, Assmann S M. 2004. Plants: the last model system for G-protein research [J]. *European Molecular Biology Organization*, **5**:572—578
- Kashino Y. 2003. Separation methods in the analysis of protein membrane complexes [J]. *Chromatography B J*, **797**:191—216
- Kato C, Mizutani T. 2004. Characterization of heterotrimeric G protein complexes in rice plasma membrane[J]. *Plant J*, **38**:320—331
- Komatsu S, Yang G. 2004. Alterations by a defect in a rice G protein α subunit in probenazole and pathogen-induced responses [J]. *Plant Cell Environ*, **27**:947—953
- Lehner I, Niehof M, Borlak J. 2003. An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins[J]. *Electrophoresis*, **24**:1 795—1 808
- Pandey S, Assmann S M. 2004. Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein subunit GPA1 and regulates Abscisic Acid signaling[J]. *Plant Cell*, **16**:1 616—1 632
- Sakmar T P. 2002. Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors; the same and not the same[J]. *Curr Opin in Cell Biol*, **14**:189—195
- Ullah H, Chen J G. 2001. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*[J]. *Science*, **292**:2 066—2 069